

⑩ 日本国特許庁 (J P)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭61-268630

⑨ Int. Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号	⑬ 公開 昭和61年(1986)11月28日
A 61 K 39/395	A C B	8214-4C	
// C 07 K 15/04		8318-4H	
C 12 N 15/00		7115-4B	
C 12 P 21/00		6712-4B	審査請求 未請求 発明の数 2 (全10頁)

⑭ 発明の名称 血栓溶解促進剤

⑮ 特 願 昭60-109256

⑯ 出 願 昭60(1985)5月23日

⑰ 発 明 者	鷺 見	芳 彦	日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社中央研究所内
⑰ 発 明 者	小 池	行 也	日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社中央研究所内
⑰ 発 明 者	市 川	弥 太 郎	日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社中央研究所内
⑰ 発 明 者	吉 田	信 彦	栃木県河内郡南河内町大字薬師寺3311-58
⑰ 発 明 者	青 木	延 雄	東京都文京区本郷4-20-2-304
⑱ 出 願 人	帝 人 株 式 会 社		大阪市東区南本町1丁目11番地
⑲ 代 理 人	弁理士 前田 純博		

明 細 書

1. 発明の名称

血栓溶解促進剤

2. 特許請求の範囲

1. ヒト α_1 -プラスミンインヒビターに対するモノクローナル抗体であつて、ヒト α_1 -プラスミンインヒビターにおけるプラスミンの繊維素溶解阻止作用を抑制するモノクローナル抗体を有効成分とする血栓溶解促進剤。
2. ヒト α_1 -プラスミンインヒビターに対するモノクローナル抗体であつて、ヒト α_1 -プラスミンインヒビターにおけるプラスミンの繊維素溶解阻止作用を抑制する少なくとも Fab 部分を有するモノクローナル抗体を有効成分とする血栓溶解促進剤。

3. 発明の詳細な説明

a. 産業上の利用分野

本発明はヒト α_1 -プラスミンインヒビター (α_1 -plasmin inhibitor ; α_1 -antiplasmin)

に対するモノクローナル抗体、特にヒト α_1 -プラスミンインヒビターの繊維素溶解部位 (reactive site) を抗原として認識し、その結果ヒト α_1 -プラスミンインヒビターの、プラスミンの繊維素溶解作用に対する阻害活性を抑制し、溶解促進させる働きを有するモノクローナル抗体を有効成分とする、血栓症 (Thrombosis)、広汎性血管内凝固症 (D I C ; Disseminated intravascular coagulation) 等の如き血栓性疾患の新規治療剤として使用される血栓溶解促進剤に関する。

b. 従来技術

ヒトの α_1 -プラスミンインヒビターは、青木と緒井によつて最初に単離・精製され、繊維素溶解酵素のプラスミン (plasmin) のエスチラーゼ活性を瞬間的に阻害する強力な α_1 -プラスミンインヒビターであり、11.7 万の糖を含む分子量約 67,000 の1本鎖の糖蛋白質であることが知られている [Moroi & Aoki ;

The Journal of Biological Chemistry, 251, 5956-5965(1976) 参照]。

一方ヒトの α_2 -プラスミンインヒビターには3種類の活性部位があることが知られている。第1はプラスミンの繊維素溶解作用阻害部位(以下これを「リアクティブサイト」ということがある)[B. Wiman & D. Collen; The Journal of Biological Chemistry, 254, 9291-9297(1979) 参照]であり、第2はカルボキシル基末端側のプラスミン結合部位[B. Wiman & D. Collen; European Journal of Biochemistry, 84, 573-578(1978) 参照]であり、第3はアミノ基末端のフィブリン結合部位である[Y. Sakata, et al., Thrombosis Research, 16, 279-282(1979) 参照]。

ヒト α_2 -プラスミンインヒビターにおけるこれら3種類の活性部位のうち、リアクティブサイトを抗原として選択的に認識するモノクローナル抗体を提供できれば、これを使用

ヒビターに対するモノクローナル抗体であつて、ヒト α_2 -プラスミンインヒビターにおけるプラスミンの繊維素溶解阻害作用を抑制するモノクローナル抗体或いはその少なくともFab部分を有する断片を有効成分とする血栓溶解促進剤が提供される。かかる本発明の血栓溶解促進剤は、例えば血栓が原因となっている血栓性疾患を治療するために有効である。

本発明のモノクローナル抗体はケーラーとミルシュタインの方法[Köhler and Milstein, Nature 256, 495-497(1975)]として知られた手法によつて産生される。すなわち、ヒト α_2 -プラスミンインヒビターでマウスを免疫した後、このマウスの脾臓細胞をマウスミエローマ細胞と融合させ、得られたハイブリドーマ細胞は、マイクロタイタープレート(microtiter plates)に固定されたヒト α_2 -プラスミンインヒビターと反応する抗体に対し系統的に検査し選択される。このようにしてヒト α_2 -プラスミンインヒビターに

することによつてヒト α_2 -プラスミンインヒビターの繊維素溶解阻害作用を直接抑え、溶解を促進することができるので非常に興味あることである。

一方、血栓性疾患は血液の性状の変化、血液のうつ滞、血管壁の変化等により、血管内で血液が凝固する病態であり、DICは凝固活性因子の血管内侵入等により、全身の細小血管に血栓が形成された病態である。これらの治療に於て血栓の溶解を目的として、プラスミノーゲンを活性化させる為の酵素、例えばウロキナーゼの投与が行われている。しかし、血中の α_2 -プラスミンインヒビターによつてプラスミンが速やかに阻害されるので効果的ではなかつた。従つて血中の α_2 -プラスミンインヒビターのプラスミン活性阻害作用を直接抑えるモノクローナル抗体を治療に用いれば血栓を速やかに消失させる事ができる。

e. 本発明の構成

本発明によれば、ヒト α_2 -プラスミンイン

対する抗体を合成し、分泌するハイブリドーマ細胞を選別する。得られたハイブリドーマ細胞を無血清培地中で培養し、その培養上清中に分泌されたヒト α_2 -プラスミンインヒビターに対する抗体は、フィブリンプレート(fibrin plates)上でヒト α_2 -プラスミンインヒビターの繊維素溶解阻害作用を抑える活性について検査を行なう。その結果、ヒト α_2 -プラスミンインヒビターの繊維素溶解阻害作用を特異的に抑える活性を有するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞が単離された。

本発明のモノクローナル抗体は、かかるハイブリドーマ細胞が産生する産出物から得られる。かくして得られたモノクローナル抗体は、ヒト α_2 -プラスミンインヒビターのリアクティブサイトに対して単一特異的(monospecific)に作用する。

次に本発明のハイブリドーマ細胞を産生する具体的方法について詳細に説明する。

A. 抗原の単離、精製；

抗原に用いるヒト α_2 -ブラスミンインヒビターは前記青木と諸井の方法によりヒト血漿中より単離精製された。

B. ヒト α_2 -ブラスミンインヒビターによるマウスの免疫；

雄 Balb/c マウスを用いるが、他の系 (strains) のマウスを使用することもできる。その際、免疫計画及びヒト α_2 -ブラスミンインヒビターの濃度は十分な量の抗原刺激を受けたリンパ球が形成されるよう選ばれるべきである。例えばマウスに少量の α_2 -ブラスミンインヒビターで或る間隔で腹腔に放回免疫の後、さらに致回膀胱に投与した。最終免疫の数日後に融合の為に脾臓細胞を取り出す。

C. 細胞融合；

脾臓を無菌的に取り出し、それから単細胞懸濁液を調製する。それらの脾臓細胞を適当なラインからのマウス骨髓腫細胞と適

当な融合促進剤の使用により細胞融合させる。脾臓細胞対骨髓腫細胞の好ましい比率は約 20 : 1 ~ 約 2 : 1 の範囲である。約 10^6 個の脾臓細胞について 0.5 ~ 1.5 ml の融合媒体の使用が適当である。

好ましい融合促進剤としては例えば平均分子量が 1,000 ~ 4,000 のポリエチレングリコールを有利に使用できるが、この分野で知られている他の融合促進剤を使用することもできる。本発明の実施例では平均分子量 1,540 のポリエチレングリコールを用いた。

D. 融合した細胞の選択；

別の容器内 (例えばマイクロタイタープレート) で未融合の脾臓細胞、未融合の骨髓腫細胞および融合した細胞の混合物を、未融合の骨髓腫細胞を支持しない選択培地で希釈し、未融合の細胞を死滅させるのに十分な時間 (約 1 週間) 培養する。培地は薬物抵抗性 (例えば 8-アザグアニン抵抗性) で未融合の骨髓腫細胞を支持しないもの (例えば前記 HAT 培地) が使用される。この選択培地中では未融合の骨髓腫細胞は死滅する。この未融合の脾臓細胞は非腫瘍性細胞なのである一定期間後 (約 1 週間後)

細胞融合に用いる骨髓腫細胞は多く知られているが、本発明では P3-X63-Ag8-U1 細胞 (以下 P3-U1 と略記する)

[Yelton, D.E. et al., Current Topics in Microbiology and Immunology, 81, 1 (1978) 参照] を用いた。これは、8-アザグアニン耐性の細胞ラインであり、酵素ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase) が欠失しており、それゆえに HAT (ヒポキサンチン、アミノプタリン、チミジン) 培地中では生存しない。また、この細胞ラインは、それ自体抗体を分泌しない、いわゆる非分泌型である。

死滅する。これらに対して融合した細胞は骨髓腫の親細胞の腫瘍性と親脾臓細胞の性質をあわせ持つために選択培地中で生存できる。

E. 各容器中のヒト α_2 -ブラスミンインヒビターに対する抗体の確認；

かくしてハイブリドーマ細胞が検出された後、その培養上清を採取し、ヒト α_2 -ブラスミンインヒビターに対する抗体について酵素免疫定量法 (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) によりスクリーニングする。

F. ヒト α_2 -ブラスミンインヒビターに対する活性を持つ抗体を産生するハイブリドーマ細胞の選択；

ヒト α_2 -ブラスミンインヒビターに対する抗体を産生しているハイブリドーマ細胞を、無血清培地で培養して得られた、抗体を含んだ培養上澄液を調製し、ヒト α_2 -ブラスミンインヒビターと共に一定時間イン

ヤニベートした。さらにこのヒト α_2 -プラスミンインヒビター混合液にプラスミンを加え、フィブリンプレート上にのせ、フィブリン溶解面積を測定した。このようにして、ヒト α_2 -プラスミンインヒビターに対する活性を持つ抗体を産生するハイブリドーマ細胞を選抜する。

G. 目的の抗体を産生するハイブリドーマ細胞のクローン化；

目的の抗体を産生するハイブリドーマ細胞を適当な方法（例えば微定希釈法）でクローン化すると、抗体は2つの異なつた方法で産生される。その第1の方法によればハイブリドーマ細胞を一定時間適当な培地で培養することにより、その培養上清からそのハイブリドーマ細胞の産生するモノクローナル抗体を得ることができる。第2の方法によればハイブリドーマ細胞は同質遺伝子又は半同質遺伝子を持つマウスの腹腔に注射することができる。一定時間後の腹

ノクローナル抗体及び部分は、ヒト α_2 -プラスミンインヒビターのリアクティブサイトに対して単一特異的に作用する。

本発明に使用される抗体である、 α_2 -プラスミンインヒビターにおけるプラスミンの線維素溶解作用の阻止部位を特異的に認識して結合し得るモノクローナル抗体は、本発明者らによつて初めて見出され、先に特許出願された（昭和59年4月17日出願：発明の名称「モノクローナル抗体、ハイブリドーマ細胞及びモノクローナル抗体の製造方法」、昭和59年10月12日出願：発明の名称「モノクローナル抗体」）。

かくして、本発明においては前記モノクローナル抗体或いはそのFab部分を少なくとも有する抗体の断片を有効成分と含有するものであれば、それを血栓に接触させることによりそれがヒト α_2 -プラスミンインヒビターにおけるプラスミンのリアクティブサイトに特異的に作用し、結果的に血栓を溶解させるので

主動物の血栓中及び腹水中より、そのハイブリドーマ細胞の産生するモノクローナル抗体を得ることができる。

本発明で用いるモノクローナル抗体は、抗体全体を用いるのはもちろんの事、抗体を、蛋白分解酵素であるパペインを用いてPorterの方法〔R. R. Porter, Biochemical Journal 73, 119~126 (1959) 参照〕により切断し、澱竹図面の点線で囲まれた部分、いわゆるFab成分を含む溶解のモノクローナル抗体であればよい。

このモノクローナル抗体のFabの部分構造はフィブリンプレート上でヒト α_2 -プラスミンインヒビターの線維素溶解阻害作用を抑える活性について調べられた。その結果、上記のモノクローナル抗体のFabの部分構造のみでヒト α_2 -プラスミンインヒビターの線維素溶解阻害作用を特異的に抑える活性を有する事が確かめられた。

本発明のFab構造を少なくとも有するモノ

クローナル抗体及び部分は、血栓溶解促進剤として利用できる。例えば本発明の血栓溶解促進剤は、静注用製剤として使用することができ、その場合、上記モノクローナル抗体或いはそのFab部分を少なくとも有する抗体断片は広い範囲の含有割合でよく、またこれらは通常静注用として使用されている水性媒体中に溶解乃至分散して使用することができる。

以下実施例を通じて本発明を詳細に説明する。

実施例 1

(1) ヒト α_2 -プラスミンインヒビターの調製

前記、青木及び緒井の方法に従い、ヒト血漿2,360 mlからヒト α_2 -プラスミンインヒビター7.7 mgを得た。

(2) マウスの免疫

雄のBalb/cマウスをヒト α_2 -プラスミンインヒビター100 μ gと完全なフロイントのアジュバント(Complete Freund's adjuvant)とのエマルジョン(emulsion)で21日間の

間隔をおいて2回腹腔に免疫した。さらに7日後及び88日後にヒト α_2 -プラスミンインヒビター30 μ gを生理食塩水とともに静脈に追加投与した。最終免疫の4日後にその脾臓細胞を細胞融合のために用いた。

(3) 脾臓細胞の懸濁液の調製

脾臓を無菌的に取り出し、ステンレス製ノツシュを通過させることにより単細胞懸濁液が得られた。細胞をL-グルタミン0.39g/l、硫酸カナマイシン0.2g/l及びNaHCO₃2.0g/lを補充したRPMI-1640培地(GIBCO製)に移した。増殖した細胞をRPMI-1640で3回洗浄しRPMI-1640培地に再懸濁させた。

(4) 骨髓腫細胞の調製

マウス骨髓腫細胞P3-U1は、L-グルタミン0.39g/l、硫酸カナマイシン0.2g/l、NaHCO₃2.0g/l及び10%のウシ胎児血清で補充されたRPMI-1640培地(10%FCS-RPMI-1640と略記する)

(6) ヒト α_2 -プラスミンインヒビターに対する抗体産生ハイブリドーマ細胞の選択及び培養

細胞融合の1日後にHAT培地をウェル1個につき100 μ l加えた。以後2日間隔で半分量の培地を新たなHAT培地と交換して培養した。8日後、ハイブリドーマ細胞の培養上澄液中のヒト α_2 -プラスミンインヒビターに対する抗体について酵素免疫定量法によりスクリーニングをおこなった。スクリーニングに用いられた抗原はヒト α_2 -プラスミンインヒビター、第2抗体はアルカリフォスファターゼ(alkali phosphatase)標識付のウサギ抗マウス抗体であつた。

総数349個のウェルの全てが酵素免疫定量法により陽性であり、 α_2 -プラスミンインヒビターに対する抗体を産生しているという結果が得られた。

細胞の増殖が活発になつたと観察されたとき、HT培地を加えた。1日間隔で計4回HT培地を用いて培地交換をおこない、その

中で培養した。骨髓腫細胞は細胞融合の時点に細胞分裂の対数期にあつた。

(5) 細胞融合

脾臓細胞と骨髓腫細胞とを10:1の比率で無血清RPMI-1640培地中に懸濁し、5分間約200gで遠心分離した。上澄液培地を除去した後、沈降物を平均分子量1540の50%ポリエチレングリコール溶液(pH8.2)1mlと共に2分間37℃でインキュベーションした。次いで無血清RPMI-1640培地9mlを加え、細胞を5分間注意深く再懸濁した。次いでこの懸濁液を5分間約200gで遠心分離し、その後 8×10^6 細胞/mlの濃度が得られるように10%FCS-RPMI-1640培地に再懸濁し、次いで96マイクロウェルプレート上に分配した(ウェル1個につき約100 μ l)。この融合細胞は37℃において5%CO₂を使用して培養した。

後は通常の10%FCS-RPMI-1640培地を用いて培養した。

実施例2 (ヒト α_2 -プラスミンインヒビターに対する抗体を産生するハイブリドーマ細胞の選択)

上記ヒト α_2 -プラスミンインヒビターに対する抗体を産生しているハイブリドーマ細胞中からヒト α_2 -プラスミンインヒビターの組織溶解阻害活性を抑える働きを持った抗体を産生するハイブリドーマ細胞を次の方法でスクリーニングした。

各ウェルのハイブリドーマを10%FCS-RPMI-1640培地中で培養し、細胞数を約 2×10^7 個とした。この細胞を5分間約200gで遠心分離し、培養上澄液を除去した後、細胞を無血清RPMI-1640培地10mlで洗浄した。さらに5分間約200gで遠心分離し、上澄液を除去し、細胞を2-メルカプトエタノール5.0ml/l、インシュリン7.5ml/l、トラン

スフェリン 5.0 ml/ℓ, エタノールアミン 5.0 ml/ℓ, ナトリウムセレナイト 5.0 ml/ℓ, レーグルタミン 0.39 g/ℓ, 硫酸カナマイシン 0.2 g/ℓ, Hepes 2.38 g/ℓ 及び NaHCO₃ 1.5 g/ℓ で補充された RPMI-1640; Dulbecco's MEM; Ham's F-12 (2:1:1) の混合無血清培地(以下これを「MITES 培地」と略記する) 10 ml に懸濁し、3 日間培養した。

培養上澄液を回収し、これを 25 倍に濃縮した。この濃縮液 25 μl にヒト α₂-プラスミンインヒビター 0.4 μg を加え、37℃ で 30 分間インキュベーションした。次いでプラスミノゲン 0.025 ユニット及びウロキナーゼ 0.031 ユニットを加え液量を 40 μl とした。このうち 10 μl をフィブリンプレートにのせた。フィブリンプレートは、37℃、湿度 95% 以上の条件下で 18 時間静置し溶解した面積を測定した。

その結果、1D10 ハイブリドーマ細胞の産生する抗体に加えたヒト α₂-プラスミンインヒビターの線維素溶解阻害活性を完全に抑える働

きが見出された。

実施例 3

ハイブリドーマ細胞のクローニング;

ヒト α₂-プラスミンインヒビターに対する抗体の活性試験において陽性の結果を示したハイブリドーマ細胞(1D10)を次の方法でクローニングした。

1D10 細胞を 96 ウエルマイクロタイタープレートに 1 ウエルあたり 0.4 細胞となるよう希釈し、Balb/c マウス脾臓細胞をフィーダー細胞として加えプレートに分配し 10% FCS-RPMI-1640 培地で培養した。顕微鏡下で観察し、確実にシングルセルコロニーであることを認めた。ハイブリドーマ細胞の培養上澄液中のヒト α₂-プラスミンインヒビターに対する抗体につき酵素免疫定量法によりスクリーニングをおこなった。

総数 26 個のウエルが酵素免疫定量法により陽性でありヒト α₂-プラスミンインヒビターに

対するモノクローナル抗体を産生していた。

モノクローナル抗体の精製;

大量のヒト α₂-プラスミンインヒビターに対するモノクローナル抗体を産生させるために、約 10⁷ 個のハイブリドーマ細胞をプリスタンで前処理した Balb/c マウスに腹腔内注射した。約 1 週間後採取された腹水液より Ey らの方法 (P. L. Ey, S. J. Prowse and C. R. Jenkin, *Immunochimistry*, 15, 429-436 (1978) 参照) に従いプロテイン A-セファロース 4B (protein A-Sepharose 4B) カラムを用いて抗体を精製した。腹水液 2.5 ml よりヒト α₂-プラスミンインヒビターに対するモノクローナル抗体 20 μg を得た。

精製したモノクローナル抗体の特徴;

精製したモノクローナル抗体の特定のクラスを、クラス特異性抗マウス抗血清を使用してオクタロニゲル拡散試験で決定した。その結果を下記表 1 に示した。ヒト α₂-プラスミンインヒビターに対する抗体は、その多くが H 鎖 r₁,

L 鎖 K であつた。

表 1

抗 体 名	IgG ₁	IgG _{2a}	IgM	K
1B10C4		+		+
1B10G11		+		+
1D10C1	+			+
1D10F10	+			+
1D10-1F5	+			+
1D10B11	+			+
1D10-2H8	+			+

実施例 4

ヒト α₂-プラスミンインヒビターに対する抗体によるヒト α₂-プラスミンインヒビター活性の抑制

ヒト α₂-プラスミンインヒビター 1 μg と各モノクローナル抗体 5 μg を 0.05 M リン酸緩衝生理食塩水(以下 PBS と略す) 50 μl に溶解

させ、37℃で30分間インキュベーションした。次いでプラスミノゲン0.025ユニット及びウロキナーゼ0.031ユニットを加え液量を60 μ lとした。このうち10 μ lをフィブリンプレートにのせた。フィブリンプレートは37℃、湿度95%以上の条件下で18時間静置し、溶解した面積を測定した。その結果を下記表2に示した。

なお、プラスミノゲン0.025ユニットとウロキナーゼ0.031ユニットとによる溶解面積を100%とした。

表 2

抗 体 名	
1D10C1	100%
1D10F10	97%
1D10-1F5	109%
1D10B11	85%
1D10-2H8	100%
1D10-1H2	70%

で洗った。最後に凝固物を竹串から試験管に回収し、凝固物の放射活性(cpm)を測定した。元の反応液中の放射活性に対する凝固物の放射活性の割合を表3に示す。

なお表3中に通常の市販のマウスIgGを比較抗体として使用した結果を併せて示した。

表 3

抗 体 名	結合の割合(%)
1B10C4	14.3
1B10G11	16.2
1D10C1	17.4
1D10F10	17.8
1D10-1F5	17.1
1D10B11	17.6
1D10-2H8	18.5
マウスのIgG	14.0

この結果から各ヒト α_2 -プラスミンインヒビターに対するモノクローナル抗体はヒト α_2 -プ

実施例 5

ヒト α_2 -プラスミンインヒビターとフィブリンの結合に及ぼすヒト α_2 -プラスミンインヒビターに対するモノクローナル抗体の効果

I¹¹⁴ 標識したヒト α_2 -プラスミンインヒビター0.01 μ Mと α_2 -プラスミンインヒビターに対するモノクローナル抗体0.05 μ Mを2%牛血清アルブミン0.05 M トリス緩衝液(pH 7.4) - 0.15 M NaCl を加えて、37℃で30分間インキュベーション後、4℃で一晩放置した。この抗原-抗体反応混液中、2.5 mM CaCl₂, 7 μ M フィブリノーゲン5分、2 ユニット/ μ l トロンビンを加え、全量で100 μ lとし37℃で30分間インキュベーションした。凝固物(フィブリン塊)の形成が認められた。30分後に200 mM EDTAを100 μ l加え、カルシウムイオンを除いた後、竹串でこの凝固物を巻き取った。竹串に巻き取った凝固物は5分間、3回洗浄液(2% BSA, 0.05 M トリス緩衝液(pH 7.4), 0.15 M NaCl, 2 mM EDTA)

ラスミンインヒビターのフィブリン結合部位を認識していないモノクローナル抗体であることがわかる。

実施例 6 (ヒト α_2 -プラスミンインヒビターのリアクティブサイトを認識するモノクローナル抗体の検索)

本実施例はヒト α_2 -プラスミンインヒビターによるプラスミンの不活性化に及ぼす α_2 -プラスミンインヒビターに対するモノクローナル抗体の効果を調べたものである。

α_2 -プラスミンインヒビター0.15 μ Mと α_2 -プラスミンインヒビターに対するモノクローナル抗体0.75 μ Mを2%牛血清アルブミン溶液0.05 M トリス緩衝液(pH 7.4), 0.15 M NaCl) 中で37℃、30分間インキュベーションし、4℃で一晩放置した。

この反応混液60 μ lとプラスミン溶液(0.47 μ M) 20 μ lを混ぜ、0.05 M トリス緩衝液(pH 7.4), 0.15 M NaCl を加えて全量

を500 μ gとしたものを各サンプルについて2本ずつ用意し、37℃で2分又は20分間インキュベーションした。次に3.5 mM 合成基質S-2251 (H-D-バリル-L-ロイジル-L-リジル-p-ニトロアニリド・二塩酸塩)を200 μ g加え、分光光度計(Beckman, DU-8)によつて単位時間当りの405 nmの波長における吸光度の変化を測定した。対照としてプラスミンのみを反応させた試料とモノクローナル抗体を加えずにヒト α_1 -プラスミンインヒビターとプラスミンを反応させた試料についても同様に吸光度の変化を調べた。その結果を下記表4に示した。

表 4

抗 体 名	吸 光 度 変 化 (405 nm/分)	
	反応時間2分	反応時間20分
1B10C4	0.008	—
1B10G11	0.012	—
1D10C1	0.140	0.108
1D10F10	0.145	0.110
1D10-1F5	0.150	0.100
1D10B11	0.162	0.109
1D10-2H8	0.150	0.103
プラスミンのみ	0.122	0.102
(α_1 -プラスミンインヒビター+プラスミン)のみ	0.026	0.005

以上実施例5及び6の結果から本発明のモノクローナル抗体はヒト α_1 -プラスミンインヒビターのリアクティブサイトを特異的に認識し、プラスミン結合部位及びフィブリン結合部位のいずれをも認識していないことがわかった。

実施例7

ヒト α_1 -プラスミンインヒビターのリアクティブサイトを認識するモノクローナル抗体のパバインによる切断

ヒト α_1 -プラスミンインヒビターのリアクティブサイトを特異的に認識する上記実施例記載のモノクローナル抗体1D10C1 1 μ gを溶解液〔2 mM EDTA, 12.5 mM シス테인, 50 mM トリス緩衝液(pH 7.4), 0.15 M NaCl〕300 μ gに溶解し、1 μ g/ μ l濃度のパバイン溶液100 μ gを加え、37℃で18時間反応させた。

この反応液を液体クロマトグラフィーにかけ、Fab成分を分取した。これをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により、還元条件及び非還元条件下で分子量を測定したところ、抗体のH鎖(Heavy chain)のアミノ末端端より分子量約23,000の断片と分子量約23,000のL鎖全体から成るFab成分であることが確認された。

実施例8

ヒト α_1 -プラスミンインヒビターに対する抗体のFab成分によるヒト α_1 -プラスミンインヒビター活性の抑制

ヒト α_1 -プラスミンインヒビター1 μ gと、各モノクローナル抗体3 μ gを0.05 M PBS50 μ gに溶解させ37℃で30分間インキュベーションした。次いでプラスミノーゲン0.025ユニット及びウロキナーゼ0.031ユニットを加え液量を60 μ gとした。このうち10 μ gをフィブリンプレートにのせた。フィブリンプレートは37℃湿度95%以上の条件で18時間静置し、溶解した面積を測定した。その結果を下記表5に示した。なお下記表の値は、プラスミノーゲン0.025ユニットとウロキナーゼ0.031ユニットとによる溶解面積を100%とした時の相対値である。

表 5

抗 体 名	
1D10C1	100%
1D10C1Fab	100%

また、実施例6と同様の方法でこのモノクローナル抗体のFab成分によるヒト α_2 -プラスミンインヒビター活性の抑制の検討をおこなった。

α_2 -プラスミンインヒビター 0.6 μ g (9 pmol) と α_2 -プラスミンインヒビターに対するモノクローナル抗体 40 pmol を 2% 牛血清アルブミン溶液 (0.05 M トリス緩衝液 (pH 7.4), 0.15 M NaCl) 60 μ l に溶解し、37℃、30 分間インキュベーションし、4℃で一晩放置した。

この反応溶液とプラスミン溶液 (0.47 μ M) 20 μ l を混ぜ、0.05 M トリス緩衝液 (pH 7.4) 0.15 M NaCl を加えて全量を 500 μ l とした。次に 3.5 mM 合成基質 S-2251 水溶液を 200 μ l 加え、分光光度計 (日立 100-50) によ

って 405 nm の波長における単位時間当りの吸光度の変化を測定した。対照としてプラスミンのみを反応させた試料とモノクローナル抗体を加えずにヒト α_2 -プラスミンインヒビターとプラスミンを反応させた試料についても同様に吸光度の変化を調べた。その結果を下記表6に示した。

表 6

抗 体 名	吸光度変化 (405 nm/分)
1D10C1	24.8×10^{-3}
1D10C1 Fab	26.0×10^{-3}
プラスミンのみ	24.0×10^{-3}
(α_2 -プラスミンインヒビター + プラスミン)のみ	8.4×10^{-3}

以上実施例8の結果から、本発明のFabを有するモノクローナル抗体はヒト α_2 -プラスミンインヒビターのリアクティブサイトを特異的に認識し、ヒト α_2 -プラスミンインヒビターの繊維素溶解阻止作用を抑制することがわかった。

実施例 9

ヒト血液を用いた血栓溶解試験

正常人血液 150 μ l にトロピン溶液 (200 ユニット/ml) 60 μ l を加え、37℃で2分間加温して血液を凝固させ凝固塊を得た。一方、正常人血液 290 μ l に、 α_2 -プラスミンインヒビターに対するモノクローナル抗体溶液 (1D10C1; 3.39 mg/ml) を 27 μ l 加え、37℃で30分間加温した。これにプラスミン溶液 (1,000 ユニット/ml) 100 μ l を加え同時に凝固塊を浸し、37℃で加温した。比較対照としてモノクローナル抗体溶液の代わりにリン酸緩衝生理食塩水で置換えたものと、凝固塊溶解時間を比較した。その結果、 α_2 -プラスミンインヒビターに対するモノクローナル抗体を用いた場合、凝固塊は約2時間で完全に溶解したのに比べ、モノクローナル抗体を用いない場合には10時間以上を要した。

実施例 10

ヒト血液を用いた血栓溶解試験

正常人血液 150 μ l にトロピン溶液 (200 ユニット/ml) 60 μ l を加え、37℃で2分間加温して血液を凝固させ、凝固塊を得た。一方、正常人血液 300 μ l に、 α_2 -プラスミンインヒビターに対するモノクローナル抗体溶液 (1D10C1; 3.39 mg/ml) を 27 μ l 加え、37℃で30分間加温した。これにプラスミン溶液 (1,000 ユニット/ml) 100 μ l を加え、同時に凝固塊を浸し37℃で加温した。比較対照としてモノクローナル抗体溶液の代わりにリン酸緩衝生理食塩水で置換えたものと、凝固塊溶解時間を比較した。その結果、 α_2 -プラスミンインヒビターに対するモノクローナル抗体を用いた場合、凝固塊は約2時間で完全に溶解したのに比べ、モノクローナル抗体を用いない場合には10時間以上を要した。

4. 図面の簡単な説明

添付図面は、本発明におけるモノクローナル

抗体を、パパインを用いて分解したときの抗体の Fab の部分構造を示す図である。図中 V は可変領域、C は定常領域を示す。

特許出願人 帝人株式会社
代理人 弁理士 前田 純 博

